2012 年 5 月作成

製品コード:69503

研究用試薬

DNA/RNA 抽出キット

MORA-EXTRACT

取扱説明書

目 次

1:キットの構成 1
2:使用目的 1
3:操作に必要な試薬・機器類 1
4:基本操作 2
5:基本操作フロー図 3
6:検体別核酸抽出プロトコール 4
A)便からの微生物 DNA/RNA 抽出 4
A-1) 水様性下痢糞便の細菌 DNA/RNA 抽出 4
A-2) 正常糞便の細菌 DNA/RNA 抽出 5
A-3) 下痢便のウィルス RNA 抽出 6
B)喀痰-咽頭擦過物からの病原体 DNA/RNA 抽出 8
B-1) 喀痰からの細菌・カビ DNA/RNA 抽出 8
B-2) 喀痰からのウィルス DNA/RNA 抽出 9
B-3) 咽頭擦過物からの細菌・ウィルス DNA/RNA 抽出 11
B-4) うがい液からの細菌・ウィルス DNA/RNA 抽出 12
C)血液からの病原体 DNA/RNA 抽出 13
C-1) 全血液からの病原体 DNA/RNA 抽出 13
C-2) 血清からのウィルス DNA/RNA 抽出 14
D)集落および培養液からの病原体 DNA/RNA 抽出 16
D-1) 菌数の少ない Culture Bottle 中の細菌・カビ DNA/RNA 抽出 16
D-2) 集落-培養液の病原体 DNA/RNA 抽出 17

E)尿路からの病原体 DNA/RNA 抽出 18
E-1) 尿道分泌液からの細菌・ウィルス DNA/RNA 抽出 18
E-2) 初尿からの細菌・ウィルス検査 DNA/RNA 抽出 20
F)食品からの病原体 DNA/RNA 抽出 21
F-1) 液体(固形物が入っていないジュース等)からの DNA/RNA 抽出 21
F-2) 半流動(ミルク、アイスクリーム等)からの DNA/RNA 抽出 21
F-3) 固形物(食肉等)からの DNA/RNA 抽出 21
F-4) 海産物(生牡蠣等)からの DNA/RNA 抽出 22
G)眼科材料など微量検体からの病原体 DNA/RNA 抽出 23
H)環境水からの微生物 DNA/RNA 抽出 24
H-1) 汚染がひどい環境水からの微生物 DNA/RNA 抽出(遠心濃縮)
(風呂水、河川水、冷却塔などの汚染がひどい水) 24
H-2) 浄水の DNA/RNA 抽出(濾過濃縮)
(水道水、蒸留水など微量の細菌汚染を検査する際の方法) 25
I)土壌コンポストからの微生物 DNA/RNA 抽出 26
7. 抽出 DNA の PCR による遺伝子増幅反応における使用方法 30
8. 使用上又は取扱い上の注意 31
9. 貯法 32
10. 有効期間 32

1:キットの構成 （50 回分）

1)ライシスバッファー（医薬用外毒物） （2-メルカプトエタノール 0.72%含有）	10mL×1 本
2)ビーズ充填チューブ	50 本
3)SDS 溶液[+]	10mL×1 本
4)フェノール混合液（医薬用外劇物） （フェノール 42%含有）	20mL×1 本
5)DEPC 処理水（精製核酸溶解用）	10mL×1 本
6)実験用 2mL チューブ	50 本
7)実験用紙製スタンド	1 個
8)取扱説明書	1 部

2:使用目的

微生物等からの核酸（DNA/RNA）抽出

（このキットは遺伝子増幅反応の前段階として、様々な検体からそこに含まれる病原体等の核酸を簡便に抽出・精製するために開発されました。特に、微量検体に対して優れた性能を発揮します。）

3:操作に必要な試薬・機器類

＜試薬・消耗品＞

1)99%エタノール

2)70%エタノール（99%エタノールと DEPC 処理水又は滅菌蒸留水を7:3で混合し調製します）

3)滅菌 2mL マイクロチューブ

4)滅菌チップ（1000μ L、及び 200μ L 用;フィルター付を推奨します）

5)RNase Free 10mM Tris - 1mM EDTA pH8.0 又は pH7.6（TE buffer）（抽出 DNA/RNA を保存する場合）

＜機器＞

1)ウォーターバスまたはヒートブロック

（操作開始前に 70℃（及び必要時は 90℃）に上げておきます。90℃はヒートブロックを使用します）

2)細胞破砕機（次の機器を推奨します）

・ディスラプター・ジェニー（Scientific Industries; エムエス機器）

3)マイクロピペット（200-1000μ L 用、20-200μ L 用、2-20μ L 用）

4)ミキサー（Vortex）

5)微量高速遠心機

6)紫外可視分光光度計（抽出 DNA/RNA の量を定量する場合）

7)卓上ミニ遠心機（側壁やフタ裏についた液体を落とす場合）

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

4:基本操作

臨床検体・食品・環境由来の検体の場合、それぞれの検体別に懸濁、均質化、沈殿、または濃縮等の前処理が必要になります。前処理後の基本操作は、次のようになります。

1)培養菌液、菌体を生理食塩水等に懸濁させた菌液や前処理済みの検体を滅菌済みの 2mL マイクロチューブに取り、15,000 rpm(又は 12000 xG 以上)、3-5 分間遠心します。沈殿促進剤が必要な場合は 15-20 分間に延長して下さい。

2)遠心後、上清を捨てた後の沈殿または液に 150μ L のライシスバッファーを加え、良く混ぜて懸濁します。
(ライシスバッファー中に沈殿が生じた場合は、使用前に室温に戻し沈殿を溶解させて下さい)

3)懸濁液をビーズ充填チューブに移し、70-90℃[注1]で 10 分間加熱して溶菌を促進させます。
注 1:RNA を抽出する場合 70℃で処理を行って下さい。DNA を抽出する場合は通常 70℃で抽出可能ですが、グラム陽性菌を対象とする場合は 90℃で処理することで破砕効率が高まります。

4)加熱処理後、ディスラプター・ジェニー(Scientific Industries)で 2 分間、破砕処理します。
破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です[注2]。
注 2:<u>上記以外の破砕条件では、ビーズ充填チューブが破損する恐れがあります。特に、ビーズ式細胞破砕専用機器を用いて極めて強い振とうを与えないで下さい。</u>

5)破砕後、遠心機のフラッシングや卓上ミニ遠心機などでフタに付いた液を落とした後、SDS 溶液[+] 200μ L を加えて混ぜ、再び 70℃、10 分間加温します。
(SDS 溶液[+] 中に沈殿が生じた場合は、使用前に室温に戻し沈殿を溶解させて下さい)

6)400μ L のフェノール混合液[注3]を加え、混合後 15,000 rpm、3 分間遠心し、上層[注4]を付属の実験用 2mL チューブに回収します。(粗精製核酸)
注 3:上層の透明な液体を取らないよう、下層の黄色の液体のみを取ります。
注 4:黄色いフェノール層と変性した中間層(白色)が混入しないよう、上層の透明な液体のみ取ります。

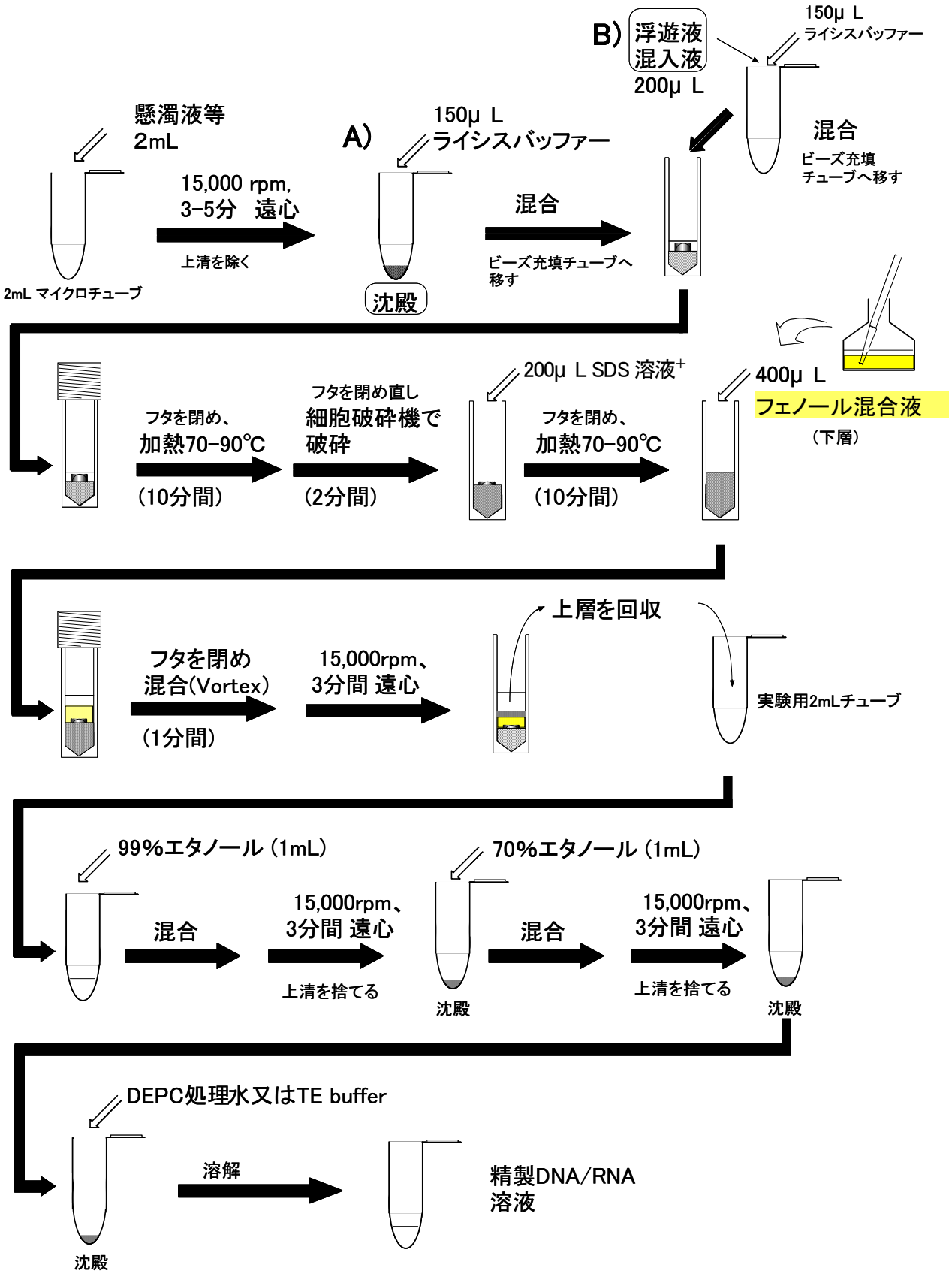
7)粗精製核酸に 99%エタノールを 1mL 加え混合(菌数が少ない場合や初心者の方には、市販の共沈剤の併用を推奨します)後、15,000rpm、3 分間遠心します。上清を捨てた後[注5]、70%エタノールを 1mL 程度加え混合後、再度 15,000rpm、3 分間遠心します。その後上清を捨て、乾燥させます。
または磁性ビーズを用いて遠心操作に替え、洗浄して精製することも可能です。
注 5:ライシスバッファーの成分が残る場合がありますので、上清は完全に取り除くようにして下さい。

8)乾燥させた沈殿に、200μ L の DEPC 処理水(すぐ使用する場合)または TE buffer(保存する場合)を加え溶解させます。(精製核酸)

次頁に基本操作フローを記載します。
なお、それぞれの検体によって前処理操作や基本操作の液量が異なる場合がございますので、それぞれの検体用のプロトコールも参照ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

5:基本操作フロー

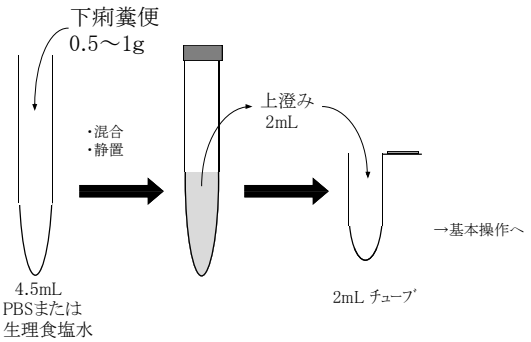


この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

6:検体別核酸抽出プロトコール

A)便からの微生物 DNA/RNA 抽出

A-1)水様性下痢糞便の細菌 DNA/RNA 抽出



下痢便の前処理

下痢糞便 0.5g-1gに PBS もしくは 生理食塩水 4.5-9mL を加え良く混合します。

＊こうすることで 2mL ﾁｭｰﾌﾞへ安全に糞便懸濁液を移し易くすると共に、糞便が均一化され検査の再現性を上げることができます。

下痢便の処理

1. 下痢糞懸濁液2mL を実験用 2mL チューブに移し、微量高速遠心機で 15000 rpm、3 分間遠心し、上澄みを捨てます。沈殿に **150μ L の ライシスバッファー** (#1)を加え,良く混合し、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。

＊**ライシスバッファー**は低温で沈殿するので使用前に室温に戻し、沈殿を溶かしてから使用してください。

2. **70℃**-10 分保ち、溶菌を促進させます。 ＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。
3. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー(Scientific Industries)で、2 分間、破砕処理します。
   破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
5. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう,もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物(DNA・ RNA)を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します。

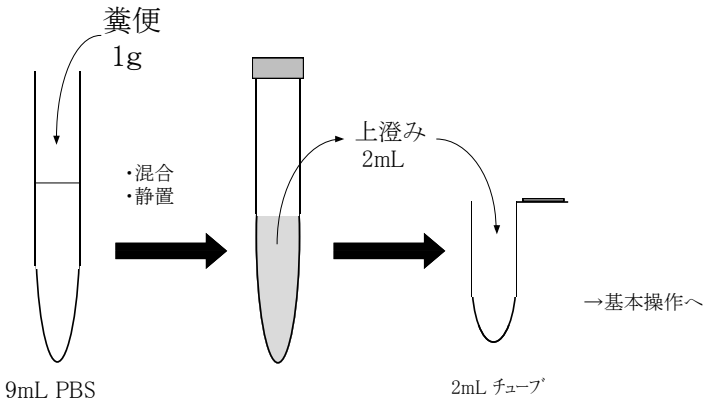
3. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

**Option:DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

A-2)正常糞便の細菌 DNA/RNA 抽出



前処理

糞便 1gを 9mLPBS もしくは 生理食塩水と混合し、糞便を良く懸濁させます。約1-2分、静置し、上澄み2mL を細菌検査に使用します。(この操作で大きな食物残査を除いて糞便を均一化し、検査の再現性をあげることができます。)

糞便処理

1. 実験用 2mL チューブに2mL の糞便懸濁液を加え、微量高速遠心機で 15000rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 沈殿に **150μ L のライシスバッファー** (#1)を加え、懸濁したのち、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。
3. **70-90**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。
   ＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。
4. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー(Scientific Industries)で、2 分間、破砕処理します。
   破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
5. **破砕処理後、 200μ L の SDS 溶液**+を加え、**再び 70℃10 分**加温して溶菌を促進させます。
6. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とうもしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを 粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物(DNA・ RNA)を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します

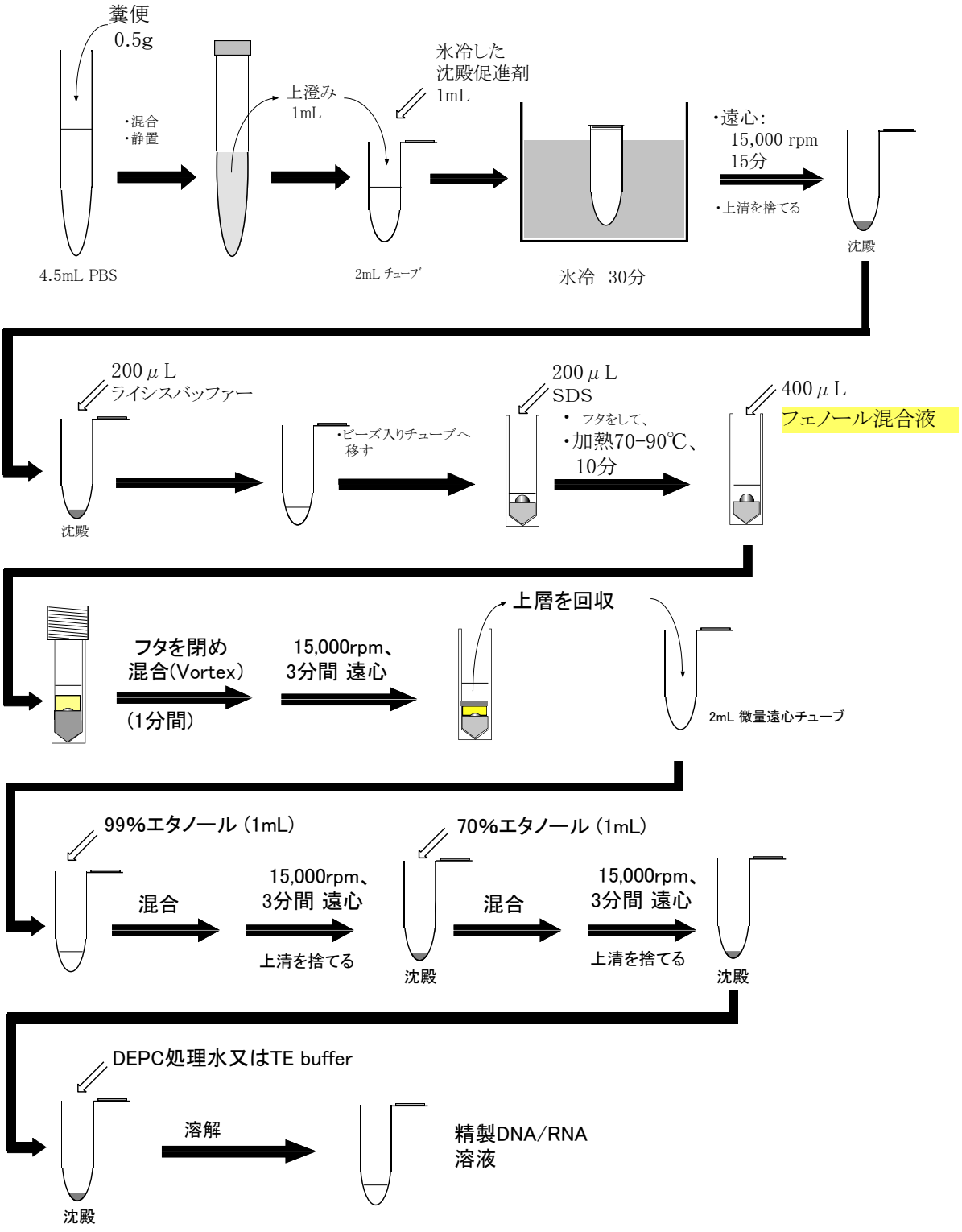
3. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

**Option:DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

A-3)下痢便のウィルス RNA 抽出



前処理

1. 下痢糞便 0.5g-1gに PBS もしくは 生理食塩水 4.5-9mL を加え混合します。しばらく静置し、1mL を RNA ウィルス検査に用います。(こうすることで 2mL チューブへ安全に糞便懸濁液を移し易くすると共に、糞便が均一化され検査の再現性を上げることができます。)残りから2mL を細菌検査に用いることもできます。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

2 RNA ウィルス検査用には、上澄み（1mL）を実験用 2mL チューブに移し、等量の沈殿促進剤を加え、氷冷で 90 分間, または 4℃で一晩放置します。

3. 15,000 rpm、20 分間、4℃で遠心し、上澄みを廃棄します。

下痢便処理

4. **200μ L の ライシスバッファー** (#1) を加えて懸濁し、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。更に **200μ L の SDS 溶液+**を加え,よく混合し、70℃で 10 分間保ちます。

5. **400 μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう、もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを 粗 RNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 RNA 液約 **200 μ L**を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。

2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します。

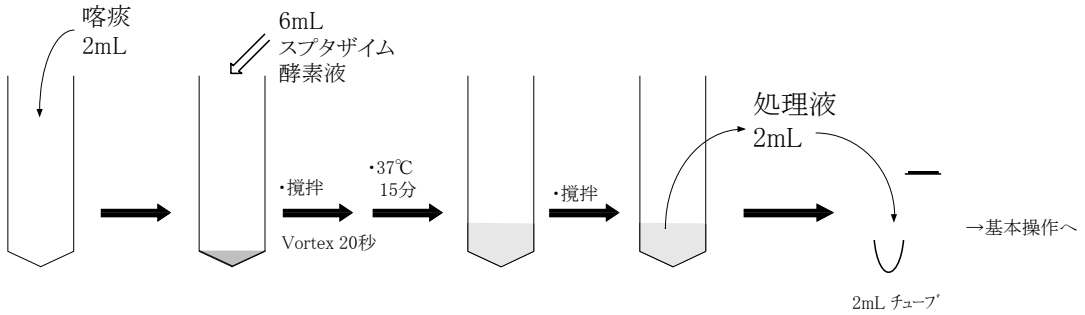
3. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

B)喀痰−咽頭擦過物からの病原体 DNA/RNA
B−1)喀痰からの細菌・カビ DNA/RNA 抽出



喀痰の前処理

1. 約 2mL の喀痰を**3倍量**の極東のスプタザイムと混合、室温、15 分，攪拌し，粘性物質を分解させます.
　＊ スプタザイムはあらかじめ処方にしたがって溶解しておいてください。
2. 約 2mL を実験用 2mL チューブに移し 15000 rpm で 3 分間、遠心、上澄みを捨て、沈殿物を細菌検査に使用します。
（1.の残りをウィルス検査用に使用することも可能です。）

喀痰の処理

3. 沈殿した喀痰の前処理物に**ライシスバッファー** (#1)を **150μ L**を加えよく懸濁し、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。70℃で 10 分間保ち、溶菌を促進させます。

＊ **ライシスバッファー**は低温で沈殿するので使用前に室温に戻し、沈殿を溶かしてから使用してください。

＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃，グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。

4. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）で、2 分間、破砕処理します。
　破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
5. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分**加温して溶菌を促進させます。
6. **400μ L の フェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とうさせます。
　もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを 粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

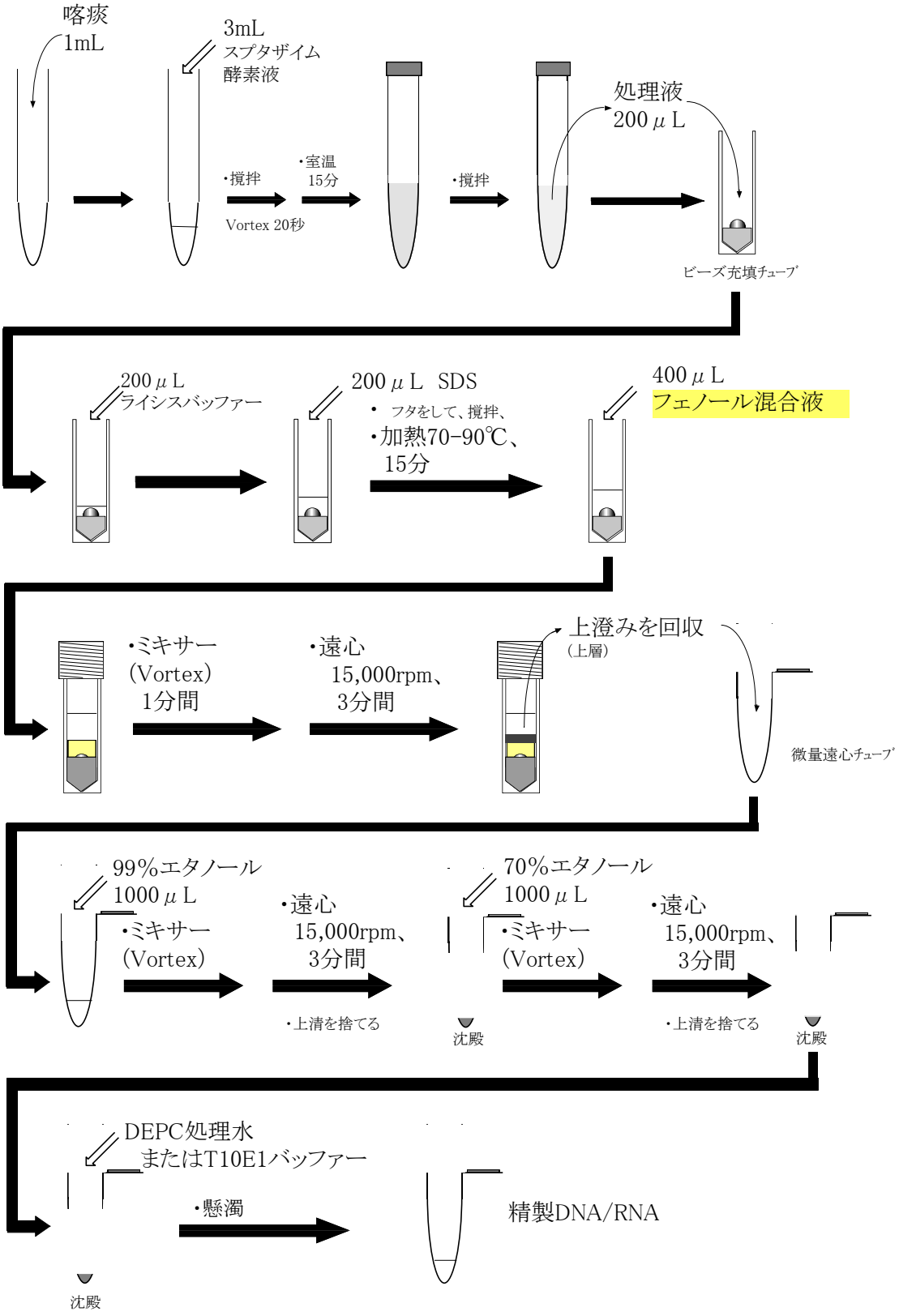
1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え，15000 rpm，3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。
　＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します。
3. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2　ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

B-2）喀痰からのウィルス DNA/RNA 抽出



この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

前処理

1. **1mL** の喀痰を 14mL 容量の tube に採取、**3倍量**の スプタザイム(極東)を加え撹拌、室温、15 分間処理後、再度良く撹拌し、200μ L をウイルス検査に使用します。

喀痰処理

2. **200μ L** をビーズ充填チューブに移し、**ライシスバッファー** (#1)**200μ L、及び SDS 溶液$^{+}$ 200μ L を**加え 70℃、15 分間加熱します。
3. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とうもしくは Vortex します。
4. 15000 rpm で5分間、遠心後, 上澄み 200μ L を粗 DNA/RNA として使用します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

5. 粗 DNA 液約**400 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
6. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します。

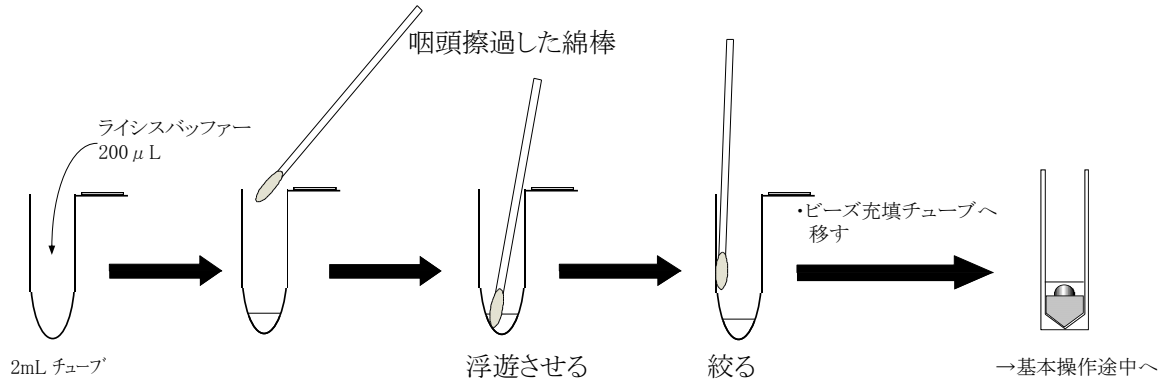
7. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

B-3）咽頭擦過物からの細菌・ウィルス DNA/RNA 抽出



1. 実験用 2mL チューブに **200μ L のライシスバッファー** (#1)を入れ、綿棒で採取した材料を加えて良く絞り込みます。
2. 綿棒を捨てて，残りの液全量をビーズ充填チューブに移し、70℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。

＊**ライシスバッファー**は低温で沈殿するので使用前に室温に戻し、沈殿を溶かしてから使用してください。
RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃，グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。

3. しっかりと蓋を閉め直した後、ディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）、2 分間、破砕処理します。
破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
5. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とうもしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを 粗 DNA 液として回収する。
＊上澄みが 100μ L 以下の場合、**200μ L の ライシスバッファー**をさらに加え、step5 を繰り返します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

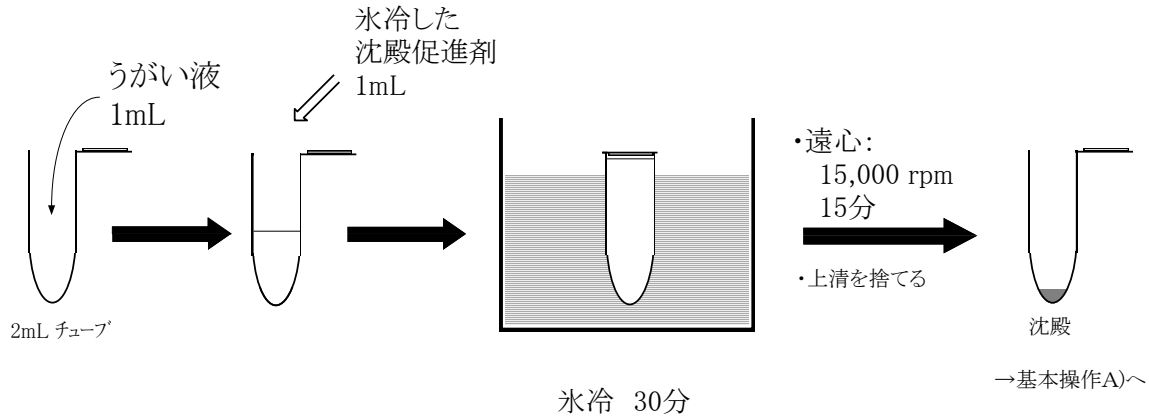
1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え，15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。
3. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

B-4) うがい液からの細菌・ウイルス DNA/RNA 抽出



1. うがい液 1mL に等量の氷冷した沈殿促進剤を加え、氷上で 30 分,あるいは、4℃、で 90 分保ちます。
2. 15000rpm, 15 分遠心し、上澄みを捨て、沈殿に **150μ L のライシスバッファー** (#1)を加え、よく混合し、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。**70**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。
3. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）で、2 分間、破砕処理します。
   破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分間加温**して溶菌を促進させます。
5. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう,もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製をおこなう。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。
3. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

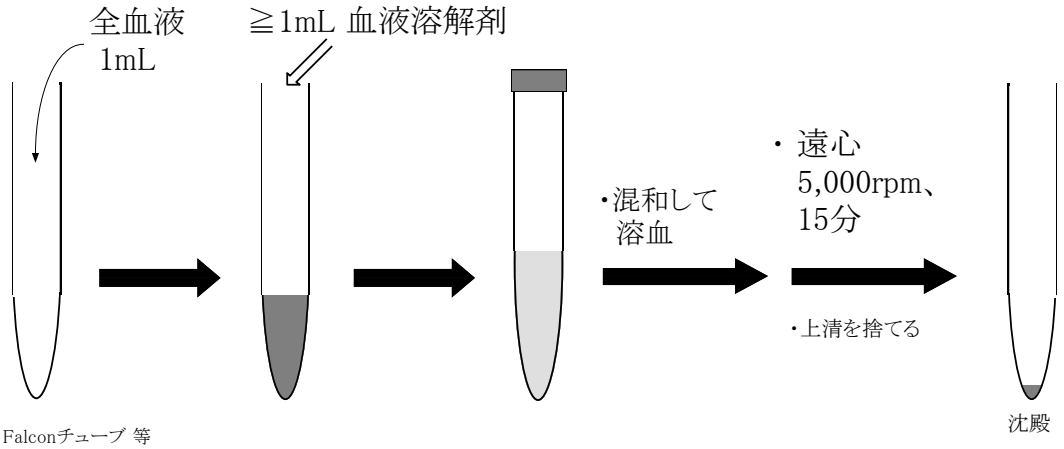
**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2　ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

C)血液からの病原体 DNA/RNA 抽出

C-1) 全血液からの病原体 DNA/RNA 抽出



→基本操作 A)へ

血液の前処理（培養不能細菌、緊急性を要する菌数の多い重症敗血症）

血液 1mL を 14mL の Falcon tube に容れ、血液処理剤を 1mL 以上加えます。よく混和して赤血球を溶解させ、4500 x G (5,000rpm)で 15 分間遠心します。

血液

1. 上清を捨て、沈殿に **150μ L のライシスバッファー**を加え,よく混合して全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。
2. **70-90**℃で 10 分間保ち、溶菌を促進させます。 ＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。
3. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）で、2 分間、破砕処理します。
   破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分**加温して溶菌を促進させます。
5. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう,もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。.
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します

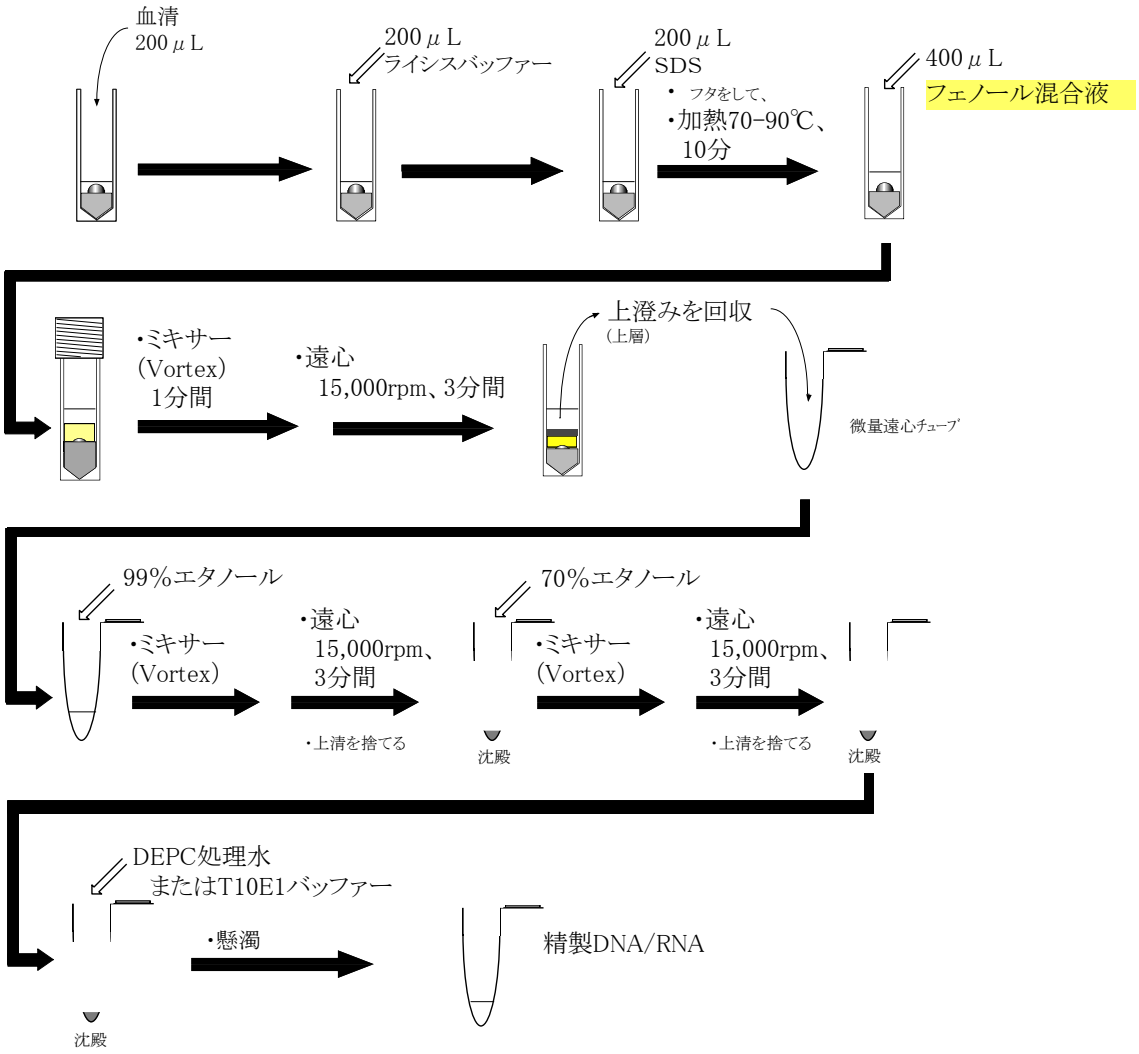
3. **200μ L の DEPC 処理水**に懸濁させます。

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2　ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

C-2）血清からのウイルス DNA/RNA 抽出



1. **ビーズ充填チューブ**に **200μ L** の血清を加え、ついで **200μ L のライシスバッファー** (#1)、及び **200μ L の SDS 溶液**+を加え,よく混合します。
2. 70℃、10 分 加熱,後、**400μ L のフェノール混合液**(#2)を当量加え,1 分間ミキサーで振とうもしくは Vortex します。
3. 微量高速遠心機で 15000 rpm で3分間遠心、上澄み(約 400μ L)を回収し、粗 DNA/RNA とします

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA/RNA 液約 **400 μ L** を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。.
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

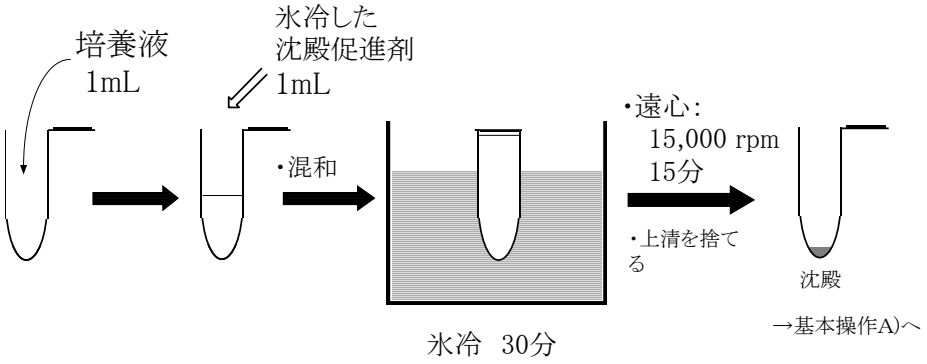
#1, #2　ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

D)集落および培養液からの病原体 DNA/RNA 抽出

D-1) 菌数の少ない Culture bottle 中の細菌・カビ DNA/RNA 抽出

血液培養で培養陽性のサインがでた時点で以下のプロトコールで核酸抽出をおこなう.



1. **1mL** の培養液を実験用 2mL チューブに容れ、**沈殿促進剤1mL** を添加して混和後, 氷冷で 30 分、もしくは 4℃ で 90 分静置させます。
2. 12000g(15000 rpm)、4℃で 15 分間遠心し、上澄みを捨てます。
3. 沈殿に **150 μ L のライシスバッファー**(#1)を加え、よくピペットで混和し, **70-90**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。
   ＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。
   ***ライシスバッファー**は低温で沈殿するので、使用前に室温に戻し、沈殿を溶かしてから使用してください。
4. 全量を**ビーズ充填チューブ**に移しディスラプター・ジェニー(Scientific Industries)で 2 分間処理し菌体を破砕します。
   破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
5. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
6. **400 μ L のフェノール混合液**(#2)加え、1 分間 Vortex します。
   ＊phenol 混合液の上澄みには Tris buffer がういているのでこの部分の液を pipett で取らないように注意してください。
7. 15000 rpm, 3 分間遠心し, 上澄み粗 DNA 液を約 200μ L を回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。.
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物(DNA・ RNA)を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します

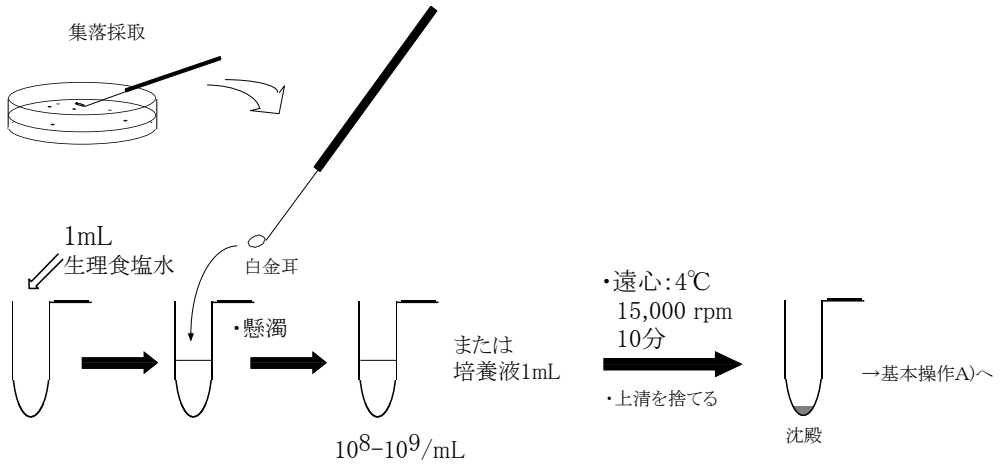
3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

**Option:DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

D-2) 集落-培養液の病原体 DNA/RNA 抽出



1. 集落の場合、**生理食塩水**が1mL 入った滅菌済微量遠心チューブに白金耳で集落をとり 10^8-10^9/mL の懸濁液をつくります。.培養液の場合1mL をｴｯﾍﾟﾝﾄﾞﾙﾌﾁｭｰﾌﾞに移し、12000g(15000 rpm) ,4℃, 10 分間 遠心し、上澄みを捨てます。
2. 沈殿に **150 μ L のライシスバッファー** (#1)を加えて、よくピペットで混和し、**ビーズ充填チューブ**に移す。
3. ディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）で 2 分間処理し菌体を破砕します。
   破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 卓上微量遠心機で蓋についた液、および泡を落とし（10000 rpm, 数秒）、**200μ L の SDS 溶液+**を加え、**70℃で 10 分加温**して溶菌を促進させます。＊菌が溶解すると溶液の透明度が増します。
5. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間 Vortex します。
   ＊ phenol 混合液の上相には酸化防止剤がはいった水相があるのでこの部分の液をとらないように注意してください。
6. 15000 rpm, 3 分間遠心し, 上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA/RNA 液約 **200 μ L** を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。
   ＊ 70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します。
3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

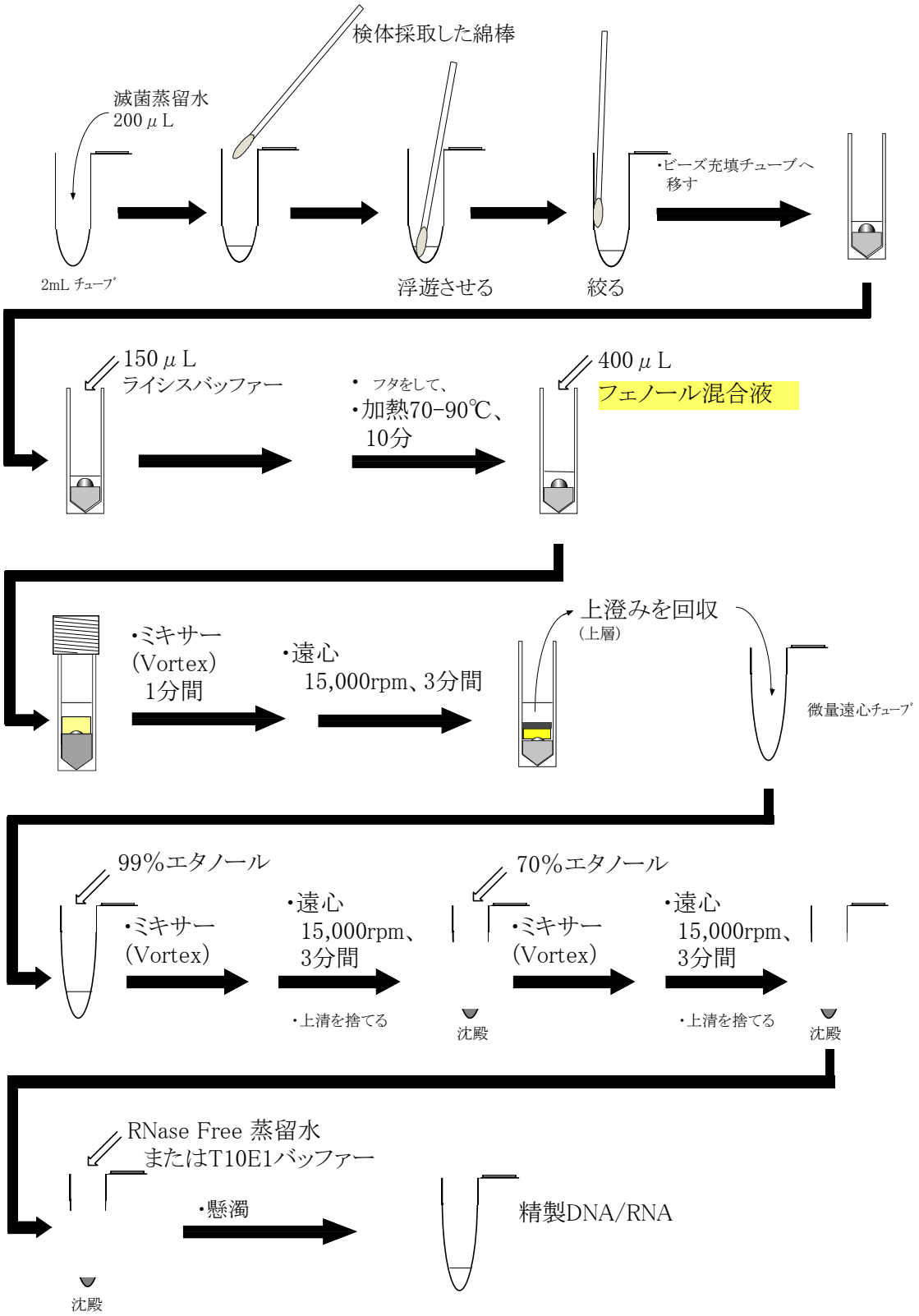
**Option：DNA 濃度が濃すぎるとRNA 増幅、およびDNA 増幅反応が抑制されるので2μ LをNanoDropを使って260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

E）尿路からの病原体 DNA/RNA 抽出

E-1）尿道分泌液からの細菌・ウィルス DNA/RNA 抽出



この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

1. 綿棒で採取した材料を**滅菌蒸留水 200μ L**が入った滅菌済微量遠心チューブに入れよく絞り、綿に付着した材料を浮遊させます。
2. 全量を**ビーズ充填チューブ**に移し,**ライシスバッファー** (#1) **200μ L** を加え混合します。
3. **70-90**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。
   ＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。SDS は不要です。
4. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう、もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。.
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA)を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。
   ＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します
3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

E-2）初尿からの細菌・ウイルス検査 DNA/RNA 抽出

1. 尿 2mL を実験用 2mL チューブに移し、15000 rpm で、**室温で3分間遠心**，上澄みを捨てます。
   （室温で遠心する以外は、基本操作と同じです。）
   ＊冷却すると塩の沈殿ができるので**室温**で遠心してください。ウイルスは細胞に感染しているもののみが対象で，上澄みのウイルスは対象外です。
2. 沈殿に **150μ L の ライシスバッファー** (#1)を加え,よく混合し、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。
   ＊**ライシスバッファー**は低温で沈殿するので、使用前に室温に戻し、沈殿を溶かしてから使用してください。
3. **70-90**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。
   ＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃，グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。
4. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）で、2 分間、振とうさせます。
   破砕機がない場合、Vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
5. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
6. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう,もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L** を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え，15000 rpm，3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。
   ＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製してください。
3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁する。**

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2　ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

F) 食品からの病原体 DNA/RNA 抽出

原則として材料を 10 倍希釈し、ストマッカー等で撹拌混合し培地に塗布します。希釈液は材料により異なります。(食品衛生法)

DNA/RNA 抽出

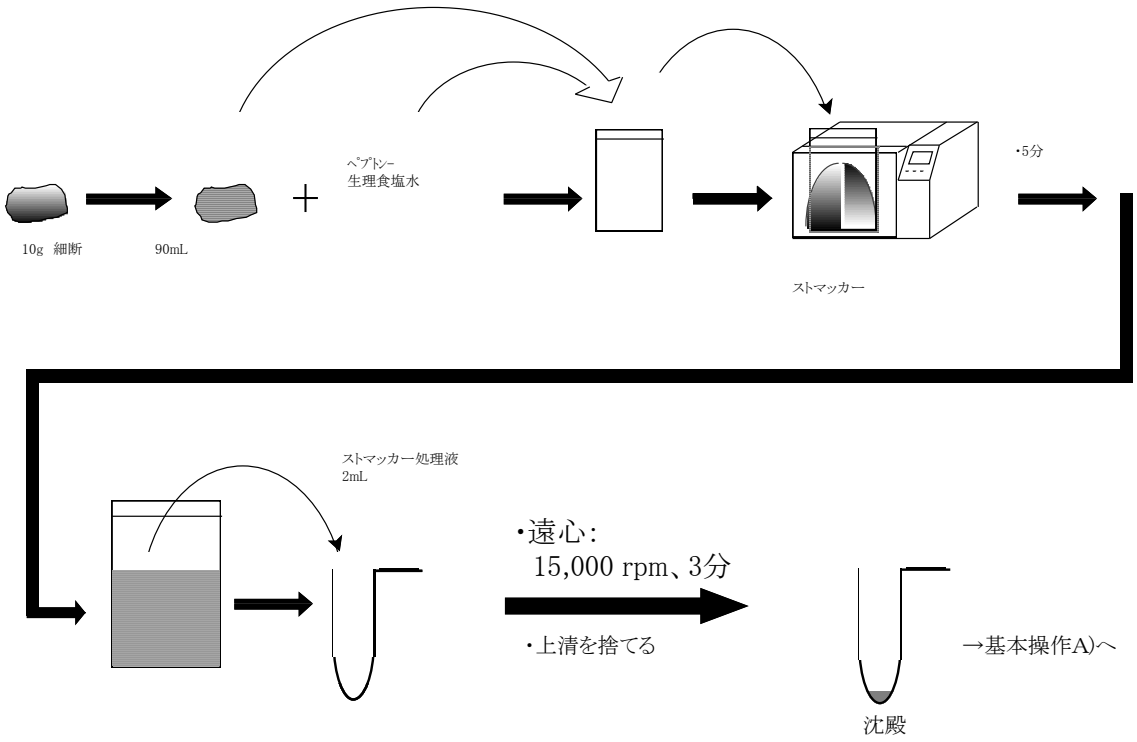
F-1) 液体(固形物が入っていないジュース等)

1. 懸濁液 2mL を 実験用 2mL チューブにいれ、15000rpm、3分遠心, 上澄みを捨てます。
2. **ライシスバッファー**(＃1)を **150μ L** 加え、**70℃**で 10 分保ち、溶菌を促進させます。
3. 全量を Beads が入った容器に移し、ディスラプター・ジェニー(Scientific Industries)で、2 分間、振とうさせます。破砕機がない場合、vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
5. **400 μ L の フェノール混合液**を加え、1 分間 ミキサーで振とう、もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し上澄みを粗 DNA 液として回収します。

F-2)半流動(ミルク、アイスクリーム等)

1. 滅菌した生理食塩水(0.85% NaCl)90mL に材料を 10g加え、混合します。
2. ストマッカーで 5 分間、処理します。
3. 2mL をとり、上記の液体処理のステップ1から始めます。

F-3)固形物(食肉等)



肉を細かく刻み、10gの肉に対して 90mL の滅菌した peptone−生理食塩水(生理食塩水 1000mL に対し、1gの peptone)を加えます。ストマッカーで 5 分間処理します。2mL をとり、上記の液体処理のステップ1から始めます。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

F-4)海産物(生牡蠣等)

90mL の滅菌したリン酸緩衝液(無水リン酸1カリウム 34gを水 500mL に溶かし、1N NaOH 175mL を加えて pH7.2 にし、全量を 1000mL 調整後、滅菌)に、材料 10gを混ぜ、ストマッカーで 5 分間、処理します。2mL をとり、上記の液体処理のステップ1から始めます。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物(DNA・ RNA)を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します

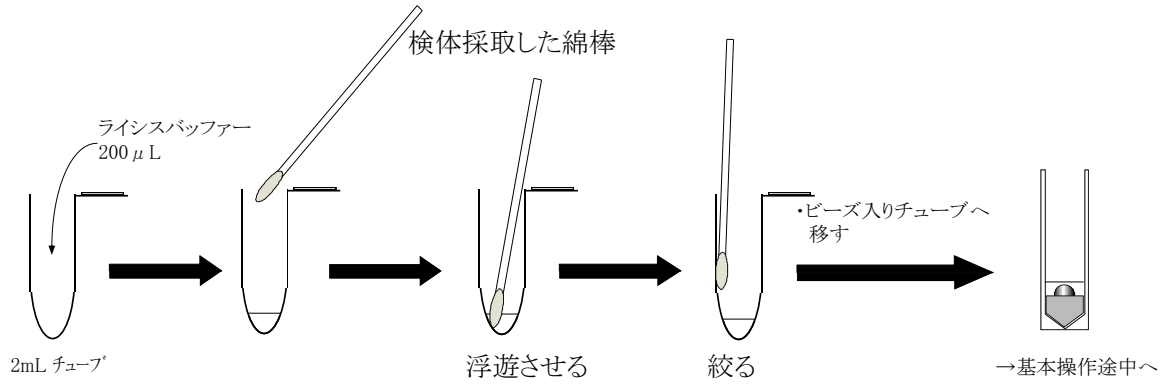
3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

**Option:DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

G) 眼科材料など微量検体からの病原体 DNA/RNA 抽出



前処理

1. **ライシスバッファー** (#1)が **200μ L** 入った滅菌済微量遠心チューブに材料を添加します。
（綿棒は攪拌してしぼりだし、液体の検体の場合は 最大 100μ L を加えてください）

処理

1. 破砕用ビーズが入った 全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。
2. **70-90**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。
＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。
3. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）で、2 分間、振とうさせます。
破砕機がない場合、vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
5. **400 μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間 Vortex にかけます。.
＊phenol 混合液の上澄みには Tris buffer がういているのでこの部分の液を pipett でとらないように注意してください。
6. 15000 rpm, 3 分間遠心し, 上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L** を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。.
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。
＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します
3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので、2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

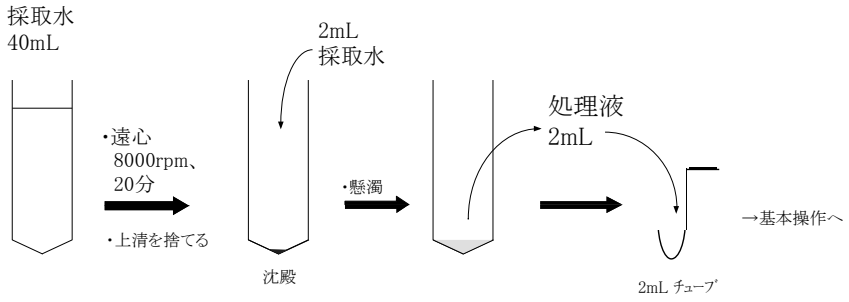
#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

H)環境水からの微生物 DNA/RNA 抽出

H-1) 汚染がひどい環境水からの微生物 DNA/RNA 抽出(遠心濃縮)

(風呂水、河川水、冷却塔などの汚染がひどい水)



濃縮操作

1. 100mL を採取し、40mL の水を遠心 tube に移し、8000rpm, 20 分で遠心します。
2. 上澄みを捨て、2mL の採取水をピペットで沈殿に加え、懸濁させます。
3. 2mL 懸濁液を 実験用 2mL チューブにいれ、15000 rpm 3 分間遠心、上澄みを捨てます。

DNA 抽出

4. 沈殿に **150 μ L のライシスバッファー** (#1)を加えて混和後、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。
   ＊**ライシスバッファー**は低温で沈殿するので、使用前に室温に戻し、沈殿を溶かしてから使用してください。
5. **70-90**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。

＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します

6. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー(Scientific Industries)で、2 分間、振とうさせます。
   破砕機がない場合、vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
7. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
8. **400μ L のフェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう,もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し**、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物(DNA・ RNA)を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します

3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

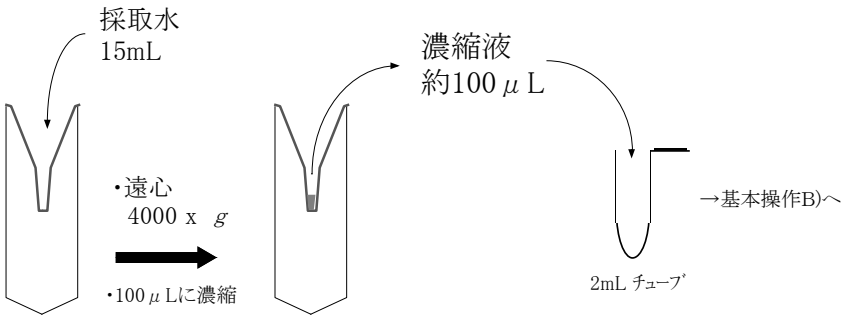
**Option:DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

H-2）浄水の DNA/RNA 抽出（濾過濃縮）

（水道水、蒸留水など微量の細菌汚染を検査する際の方法）



濃縮処理

1. 15mL の水を Millipore 濃縮用チューブに加え、メーカープロトコルに従い濃縮します。
2. 濃縮液を最終 100μ L に調整します（150 倍濃縮）。
3. 滅菌済微量遠心チューブに移します。

抽出処理

4. **150μ L の ライシスバッファー** (#1)を加え,よく混合後.全量を **ビーズ充填チューブ**に移します。

＊ライシスバッファーは低温で沈殿するので、使用前に室温に戻し、沈殿を溶かしてから使用してください。

5. **70-90**℃で 10 分保ち、溶菌を促進させます。

＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。

6. しっかりと蓋を閉めたのち、ディスラプター・ジェニー（Scientific Industries）で、2 分間、振とうさせます。
   破砕機がない場合、vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
7. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分加温**して溶菌を促進させます。
8. 400 μ L の**フェノール混合液**を加え、1 分間ミキサーで振とう、もしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し、上澄みを 粗 DNA 液として回収します。

DNA/RNA の精製

アルコール法もしくは磁気ビーズ法等で精製を行います。

アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 **200 μ L** を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移し、99%エタノール 1000μ L を加え、vortex したのち、15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを捨てます。
2. 70%のエタノール 1000μ L を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄みを マイクロピペットで吸引して捨てます。沈殿物（DNA・ RNA）を捨てないように上澄みのアルコールを取り除きます。

＊70%のエタノールを自作する場合は、99%エタノールに DEPC 処理水を加えて作製します

3. **200μ L の DEPC 処理水に懸濁させます。**

**Option：DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

I)土壌コンポストからの微生物 DNA/RNA 抽出

土壌の微生物相は環境によって大きく異なります。細菌数も 10^3 から 10^9 cfu/g と多彩です。

前処理

4gの土壌を Falcon 50 ml 容積の Tube に入れて
35mlの buffer (125mM NaCl ,50mM EDTA, PH 8.0)
1ml の 20% skim milk を加え Vortex し土壌を懸濁させます。
(この操作で大きな石、 特に Silica および DNA に吸着する PCR 阻害物質の一部を除去すると同時に、土壌サンプルを均一化させます。)

撹拌後、静置して上澄みの透明度が増すまで 5-10 分待ちます。早すぎると Phenol 抽出を2回行う必要が生じます。
15 分以上待つと菌が沈殿してきます。

土壌処理

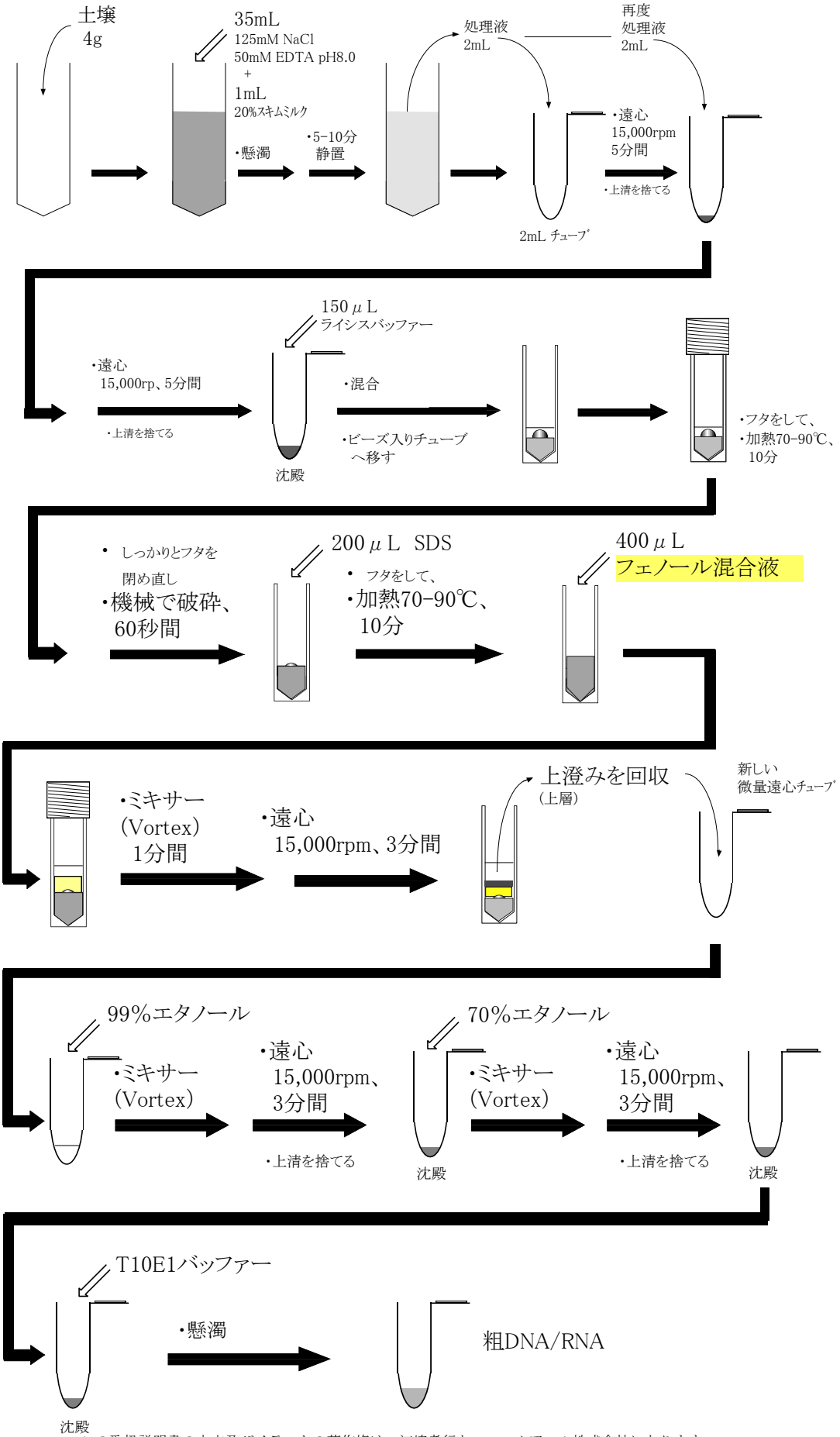
1. 2ml の土壌懸濁液を 実験用 2mL チューブに容れ、15000 rpm 5 分間遠心後、上澄みを捨て再び 2ml を加え遠心を繰り返します。上澄みを捨て、沈殿物に **150 μ L のライシスバッファー**(#1)を加え、良く懸濁後、全量を**ビーズ充填チューブ**に移します。
2. **70-90℃**で **10 分間**保ち、溶菌を促進させます。 ＊RNA の場合 70℃で処理、DNA の場合も通常 70℃, グラム陽性菌のみを対象とする場合は 90℃がより破砕効率が良くなります。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅します。
3. しっかりと蓋を閉めたのちディスラプター・ジェニー(Scientific Industries)で、2 分間、振とうさせます。
   破砕機がない場合、vortex2 分間でも DNA/RNA 抽出は可能です。
4. 破砕処理後、 **200μ L の SDS 溶液**+を加え、再び **70℃10 分間**加温して溶菌を促進させます。
5. 400μ L の**フェノール混合液**(#2)を加え、1 分間ミキサーで振とう、 もしくは 1 分間 Vortex します。
6. 15000 rpm, 3 分間遠心し、上澄み約 300μ L を滅菌した 2mL 微量遠心チューブに移します。(通常、2ml のｴｯﾍﾟﾝﾄﾞﾙﾌﾀｲﾌﾟ遠心チューブを使えば、9.でアルコールをほぼ完全に取り除くことが出来ます。)
7. 1mL の 99%エタノールを加え、転倒混和後、15000 rpm で2分間遠心します。
8. 上澄みを捨て、70%エタノール 1mL を加え、転倒混和後、15000 rpm で2分間遠心します。
9. 上澄みを注意深くピペットで捨てます。
10. DNA を風乾または、遠心乾燥機、もしくは 55℃のヒートブロックで5分間乾燥させます。
11. **200μ L の** T10E1 buffer を加え、粗 DNA 液とします。

＊Optional:DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅、および DNA 増幅反応が抑制されるので 2μ L を NanoDrop を使って 260nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm の吸光度及び比を記録し、遺伝子増幅に適正な使用量を選択してください。

この段階の粗 DNA は、腐敗酸 Humic acid を含んでいるので DNA 液は褐色になっていることが多く、このままでは遺伝子増幅反応には利用できない場合があります(目安として、260/280> 1.8 以上あればそのまま PCR に使用可能です)。
その場合は、次の粗DNA/RNAの精製例に進んでください。

#1, #2 ホームページの MSDS の注意書きをご覧ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。



この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

粗 DNA/RNA の精製例

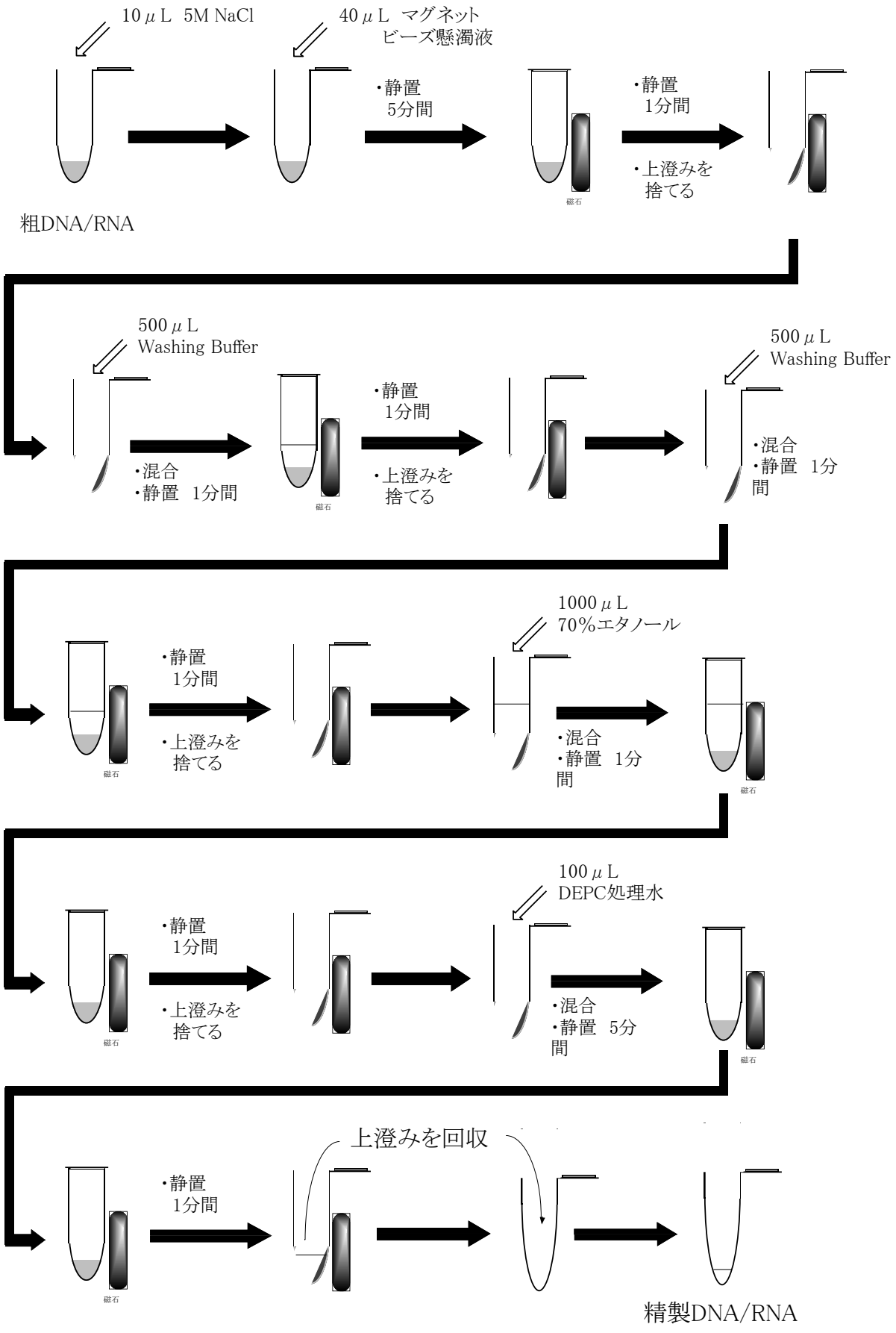
市販のシリカコートした磁気ビーズを DNA と混合すると、DNA はシリカに良く付きますが、腐敗酸 Humic acid は 磁気ビーズには殆ど吸着しないので DNA の精製ができます。

A) 磁気ビーズ法による精製例

1. 粗 DNA 液約 **200μ L** に 5M NaCl を **10μ L** 加え、微量遠心チューブに移し、**40μ L** の磁気ビーズ懸濁液を加えます。
   ＊ 磁気ビーズ懸濁液は沈殿しているので使用前によく攪拌してください。
2. 5分間静置後、磁気ビーズを捕獲し、一分後に上澄みを捨てます。
3. ビーズメーカー添付の **Washing Buffer** を **500μ L** 加え混合、一分後磁気ビーズを捕獲し上澄みを捨てます。
4. 再び **Washing Buffer** を **500μ L** 加え混合、一分後磁気ビーズを捕獲し上澄みを捨てます。
5. 70%エタノール Washing 液を **1000μ L** 加え混合、一分後磁気ビーズを捕獲し上澄みをピペットでアルコールが残らないように完全に捨てます。
6. **100μ L** の DEPC 処理水を加えます。
7. 混合後、室温に5分間静置し、磁気ビーズを捕獲して一分後に上澄みを滅菌チューブに回収します。

（次頁に図示）

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。



この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

7:抽出 DNA の PCR による遺伝子増幅反応における使用方法

1)抽出 DNA/RNA の保存方法について

抽出した DNA/RNA は速やかに氷冷してください。直ちに遺伝子増幅にかけない場合は、速やかに凍結してください。

2)抽出 DNA の濃度について

抽出した DNA を遺伝子増幅反応で使用する場合、DNA 濃度が高過ぎると PCR 反応が阻害されるので、増幅反応時に 1 チューブ当りの DNA 量が 100ng を超えないよう抽出 DNA の濃度を調整することをお奨めします(最適量は、25ng/チューブ前後)。DNA の濃度・純度については、分光光度計を用い測定する方法が一般的であるため、以下にその方法について記載いたします。

核酸濃度は次の計算式から、濃度単位μ g/mL で算出できます。

[260 nm における吸光度(A260)] x [核酸の性状固有の係数] x [セルの光路長(mm)/10]

測定機のソフトで光路長の補正がなされている場合最終項は必要有りません。

係数は二本鎖 DNA で 50、一本鎖 DNA・オリゴ DNA で 33、RNA で 40 という値が 一般的に用いられます。

抽出核酸の純度検定は、次の「吸光度比」を用いて確認します。

[260 nm における吸光度(A260)]/[280 nm における吸光度(A280)]

A280 の値は、サンプルに混入しているタンパク質 やフェノールの量 を反映するため、サンプルの吸光度比は 1.8 以上が理想的です。(この値が著しく低い場合はPCRが阻害されることがありますので、SDS 溶液[+]を加えるところから(加熱は不要)抽出・精製を繰り返すか、スピンカラム等で混入低分子物質等を除去することをお奨めします。)

3)保存用バッファー

抽出・精製した DNA/RNA は DEPC 処理水に再懸濁し、直ちに増幅反応を行うことが好ましいですが、保存する場合は RNase Free の 10mM Tris-1mM EDTA pH8.0 又は 7.6(TE buffer)に溶解してください。DNA の場合は pH8.0、RNA の場合は pH7.6 付近をご使用ください。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

8:使用上又は取扱い上の注意

1)取扱い上の注意

①細胞破砕機による破砕を行う際、推奨機器(又は卓上ミキサー)による破砕条件以外では、ビーズ充填チューブが破損する恐れがあります。特に、ビーズ式細胞破砕専用機器を用いて極めて強い振とうを与えないで下さい。

②ライシスバッファーは皮膚を刺激する物質が含まれているので、人によってはかゆみが出てきます。グローブを着用して作業を行ってください。

③フェノール混合液には、眼、皮膚、粘膜を刺激するフェノール、及び眼、鼻、のど、皮膚を刺激し、中枢神経系、肝臓等に障害を起こすクロロホルムが入っています。使用時はメガネ、マスク、グローブを着用し、充分注意して作業を行ってください。

④薬液等が皮膚、眼、粘膜に触れたり、口に入ったりしないよう充分注意して操作を行ってください。万が一、皮膚、眼、粘膜に触れたりした場合、速やかに流水で洗い流してください。

⑤試料(検体)の取扱いは微生物の取扱いに習熟した人の指導のもとにバイオハザード対策を実施した上で使用してください。

2)使用上の注意事項

①有効期限切れの製品は使用しないで下さい。

②保存条件を厳守して下さい。

ビーズ充填チューブ、SDS 溶液[+]、DEPC 処理水は室温保存も可能です。ライシスバッファー及びフェノール混合液は遮光冷蔵(2～10℃)で保存して下さい。

③容器の破損、異物混入等が認められたものは使用しないで下さい。

④RNA の取り扱いは特に慎重に行う必要があります。RNA は DNA と比べて非常に不安定で分解されやすく、チューブに空気中のホコリが混入する・チューブのフタの内側などに手を触れるなどが原因で中の RNA が分解してしまうことがあります。従って、RNA を用いる実験を行う際には、グローブ・マスクを着用し、使用するプラスチックやガラス容器類は、RNase の除去処理を行ってから使用するとともに、容器・チューブ類は、可能な限り、フタを閉めた状態を保つようにしてください。

⑤DNA を取り扱う際は、RNA の場合ほど分解酵素に対する対応をする必要がありませんが、検体以外の雑菌等が混入しないよう操作してください。

3)廃棄上の注意

①フェノール混合液にはフェノール 42%、クロロホルム 40%、ライシスバッファーには 2-メルカプトエタノール 0.72%が含まれます。使用の前後にかかわらず、廃棄方法については廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法、毒物及び劇物取締法等の規定、各自治体の指示に従い廃棄して下さい。

②薬液が作業台や床にこぼれた場合には、速やかにウェス等で拭くなどして除去後、水や(フェノール混合液の場合)アルコールを使用して新しいウェス等で良く拭き取ってください。ビーズがこぼれた場合も、出来るだけ回収し、濡れたウェス等で良く拭き取ってください。

③検体処理等に使用した器具類は、必ず高圧蒸気滅菌(121℃、30 分以上)後、適切な処置を行い廃棄して下さい。

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。

9:貯法

遮光して冷蔵

保管温度:2～10℃

10:有効期間

9ヶ月間

発売元:

極東製薬工業株式会社

〒103-0024　東京都中央区日本橋小舟町7番8号

電話番号　03(5645)5664

製造元:

AMR　Advanced Microorganism Research

エーエムアール株式会社

〒501-1111　岐阜県岐阜市大学北 2-210-1

電話番号　058(293)0610

FAX　　058(234)2487

この取扱説明書の本文及びイラストの著作権は、江崎孝行とエーエムアール株式会社にあります。